

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-003093

(43)Date of publication of application : 07.01.1997

(51)Int.Cl.

C07J 43/00
C07J 9/00
// A61K 9/127
A61K 47/28

(21)Application number : 07-155021

(71)Applicant : NIPPON OIL & FATS CO LTD

(22)Date of filing : 21.06.1995

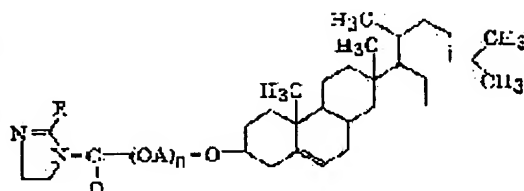
(72)Inventor : MIYAZAKI TAKESHI
YASUKOCHI TORU
SUGINAKA AKINORI
KADOMA YOSHIHITO

(54) CHOLESTEROL DERIVATIVE

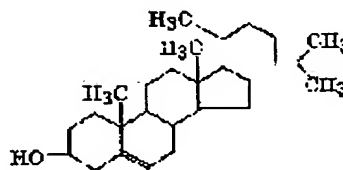
(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject new derivative which is a specific cholesterol derivative having an N-carbonylimidazolyl oxyalkylene chain, can be bonded to a functional substance at its end through a covalent bond and is useful as a component for forming a cytoplasmic membrane such as a liposome, etc.

CONSTITUTION: This cholesterol derivative of formula I (OA is a 2-4C oxyalkylen group; (n) is an average number of addition mols of the oxyalkylene groups and is a positive number of 1-1,000; when (n) is ≥ 2 , the oxyalkylene groups may be different or same and may be added in a random state or added in a block state; R is H or methyl). The derivative can be efficiently bonded to a functional substance at the end of the (poly)oxyalkylene chain through a covalent bond and is useful as a component for forming a liposome for a liquid crystal raw material, a medicine transporting material, a diagnostic, a sensor, an immobilized catalyst, etc. The compound is obtained by reacting a cholesterol of formula II with an alkylene oxide and then with N,N'-carbonylimidazole.



I



II

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

02.04.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

3391151

[Date of registration] 24.01.2003

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-3093

(43) 公開日 平成9年(1997)1月7日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 J 43/00			C 0 7 J 43/00	
9/00			9/00	
// A 6 1 K 9/127			A 6 1 K 9/127	D
47/28			47/28	D

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平7-155021

(22) 出願日 平成7年(1995)6月21日

(71) 出願人 000004341

日本油脂株式会社

東京都渋谷区恵比寿四丁目20番3号

(72) 発明者 宮崎 剛

茨城県つくば市梅園2-15-5

(72) 発明者 安河内 徹

神奈川県川崎市川崎区藤崎2-3-10-404

(72) 発明者 杉中 昭典

神奈川県茅ヶ崎市室田2-4-10

(72) 発明者 門磨 義仁

兵庫県神戸市北区小倉台3-2-6

(74) 代理人 弁理士 柳原 成

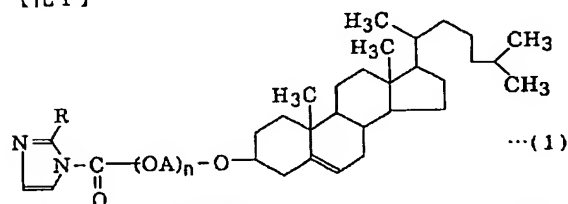
(54) 【発明の名称】 コレステロール誘導体

(57) 【要約】

【目的】 (ポリ) オキシアルキレン鎖の先端に、簡単にかつ効率よく種々の機能性物質を共有結合により固定化することができ、リボソーム等の小胞体の形成成分として利用することができる新規かつ有用なコレステロール誘導体を得る。

【構成】 下記一般式(1)で表わされるコレステロール誘導体。

【化1】



【式中、O A は炭素数2~4のオキシアルキレン基、n はオキシアルキレン基の平均付加モル数で、1~1000の正数を表わす。n が2以上の場合、オキシアルキレン基は同一でも異なってもよく、またランダム状に付加していても、ブロック状に付加していてもよい。R

は水素原子またはメチル基を表わす。】

(2)

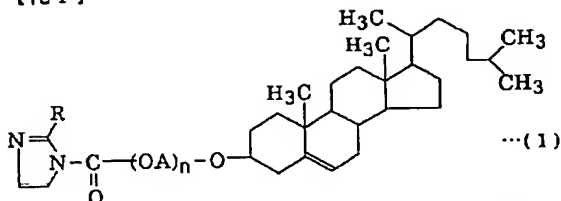
2

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記一般式(1)で表わされるコレステロール誘導体。

【化1】



〔式中、OAは炭素数2～4のオキシアルキレン基、nはオキシアルキレン基の平均付加モル数で、1～1000の正数を表わす。nが2以上の場合、オキシアルキレン基は同一でも異なってもよく、またランダム状に付加していても、ブロック状に付加していてもよい。Rは水素原子またはメチル基を表わす。〕

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、新規かつ有用なコレステロール誘導体に関する。さらに詳しくは液晶原料、医薬等の薬物運搬体、検査薬、診断薬、センサー、固定化触媒、バイオリクター、バイオエレクトロニクス素子、マイクロカプセル代替品、化粧品原料など、種々の機能性リボソームまたは脂肪乳剤等の小胞体の製造などに用いられるコレステロール誘導体に関する。

【0002】

【従来の技術】リボソームを生体内へ投与したとき、その多くは肝臓、脾臓などの網内系器官で捕捉されるため、十分な効果が得られないことが指摘されている(Cancer Res., 43, 5328(1983))。そこで、この網内系器官で捕捉されてしまう問題点や、あるいはリボソーム自身の崩壊性・凝集性など安定性の低さに関する問題点を改善する方法として、リボソームの表面にポリエチレングリコール鎖を導入することが試みられている(例えば、WO90/3484、特開平1-249717号、FEBS letters, 268, 235(1990))。また、ポリエチレングリコールで修飾されたリボソームは、長期間にわたり血液中濃度を維持できることが明らかになっている(Biochem. Biophys. Acta., 1066, 29~36(1991))。しかし、このような方法により得られるポリエチレングリコール鎖の導入されたリボソームは機能性物質と反応しないので、リボソーム表面上に機能性物質を固定化することはできない。

【0003】さらに、特開平4-346918号には、マレイミド基を有するリボソームにまずチオール基を付与したタンパク質(チオール化タンパク質)を反応させ、次いで残存マレイミド基にチオール基を付与したポリアルキレングリコール(チオール化ポリアルキレングリコール)部分を含む化合物を反応させることにより、網内系器官での取込の改善された薬剤含有抗体結合リボ

ソームが得られることが記載されている。しかし、このリボソームでは、抗体がポリアルキレングリコール層の下部に隠蔽され、標的部位の抗原との反応が妨げられるため、期待される効果が十分には得られないという問題点がある。

【0004】また特開平5-508388号には、 α -ステアリル- ω -プロピオン酸-ポリオキシエチレンに代表されるようなアニオン基を有するポリオキシエチレン誘導体からなるリボソーム製剤が開示されている。しかし、このポリオキシエチレン誘導体は、疎水部がモノアルキル基であるためリボソーム膜から脱離しやすく、このためこのようなポリオキシエチレン誘導体を膜形成成分として含むリボソームは長期間の安定性に劣るという問題点がある。

【0005】一方、コレステロールにポリエチレングリコール鎖を導入した例として、特開平1-249798号には、2,4-ビス(o-メトキシポリエチレングリコール)-6-コレステリル-s-トリアジン誘導体が開示され、この誘導体をリボソームの膜形成成分として使用することにより、リボソームの安定性が向上することが記載されている。しかし、この誘導体では、機能性物質などを固定化することは考慮されていない。

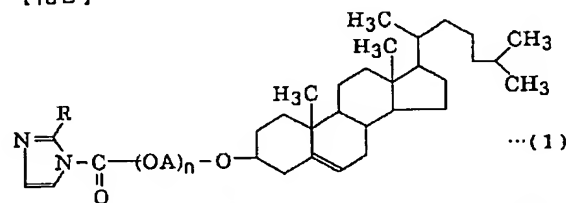
【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、(ポリ)オキシアルキレン鎖の先端に、簡単にかつ効率よく種々の機能性物質を共有結合により固定化することができ、リボソーム等の小胞体の形成成分として利用することができる新規かつ有用なコレステロール誘導体を提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明は、下記一般式(1)で表わされるコレステロール誘導体である。

【化2】



〔式中、OAは炭素数2～4のオキシアルキレン基、nはオキシアルキレン基の平均付加モル数で、1～1000の正数を表わす。nが2以上の場合、オキシアルキレン基は同一でも異なってもよく、またランダム状に付加していても、ブロック状に付加していてもよい。Rは水素原子またはメチル基を表わす。〕

【0008】本発明において、「(ポリ)オキシアルキレン」は「オキシアルキレンおよび/またはポリオキシアルキレン」、「(ポリ)アルキレン」は「アルキレンおよび/またはポリアルキレン」を意味する。

【0009】一般式(1)のOAで表わされるオキシア

ルキレン基は、炭素数2~4のオキシアルキレン基であり、オキシエチレン基、オキシプロピレン基、オキシトリメチレン基、オキシ-1-エチルエチレン基、オキシ-1,2-ジメチルエチレン基、オキシテトラメチレン基などがあげられる。これらのオキシアルキレン基は、エチレンオキシド、プロピレンオキシド、オキセタン、1-ブテンオキシド、2-ブテンオキシド、テトラヒドロフランなどのアルキレンオキシドを付加重合させた基である。

【0010】一般式(1)のnは1~1000、好ましくは10~300、さらに好ましくは20~120の正数である。nが2以上の場合、オキシアルキレン基の種類は同一のものでも、異なるものでもよい。後者の場合、ランダム状に付加していても、ブロック状に付加していてもよい。

【0011】親水性を付与する場合、OAとしてはエチレンオキシドが単独で付加したものが好ましく、この場合、nが10以上のものが好ましい。また種類の異なるアルキレンオキシドが付加している場合、エチレンオキシドが20モル%以上、好ましくは50モル%以上付加しているのが望ましい。(ポリ)オキシアルキレン鎖に親油性を付与する場合はエチレンオキシド以外の付加モル数を多くする。

【0012】一般式(1)で表わされるコレステロール誘導体は、例えば次のような2段階の反応により、容易に製造することができる。まず第1段階目の反応では、コレステロール中の水酸基にアルキレンオキシドを付加重合させ、コレステロールの(ポリ)オキシアルキレン付加物(以下、Chol-OAと略す)を製造する。この際、コレステロールとアルキレンオキシドとの仕込み

モル比は、目的とする(ポリ)オキシアルキレンの繰返し数に応じて選択し、例えば1:1~1:10000、好ましくは1:10~1:300とするのが望ましい。反応は、触媒として金属ナトリウム、金属カリウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどを用い、溶媒としてトルエン、ベンゼン、クロロホルム、四塩化炭素などの有機溶媒を用い、0~150℃で、30分間~200時間攪拌することにより行うことができる。

【0013】次に第2段階目の反応では、第1段階目の反応で得られたChol-OAの末端の水酸基を、N, N'-カルボニルジイミダゾールまたはその置換体を用いてN-カルボニルイミダゾール化する。この際、Chol-OAとN, N'-カルボニルジイミダゾールまたはその置換体との仕込みモル比は、1:0.5~1:10、好ましくは1:0.9~1:2とするのが望ましい。反応は、無溶媒で、あるいはベンゼン、トルエン、クロロホルム、四塩化炭素、アセトニトリル、酢酸エチル、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセタミド、ジメチルスルホキシド等の有機溶媒を用いて、-100~+150℃、好ましくは0~80℃で、1分間~200時間、好ましくは30分間~6時間攪拌することにより行うことができる。反応終了後は、蒸留、再結晶、再沈殿、吸着剤処理、カラム処理、イオン交換、ゲル濾過、限外濾過、透析などの方法により単離・精製することができる。

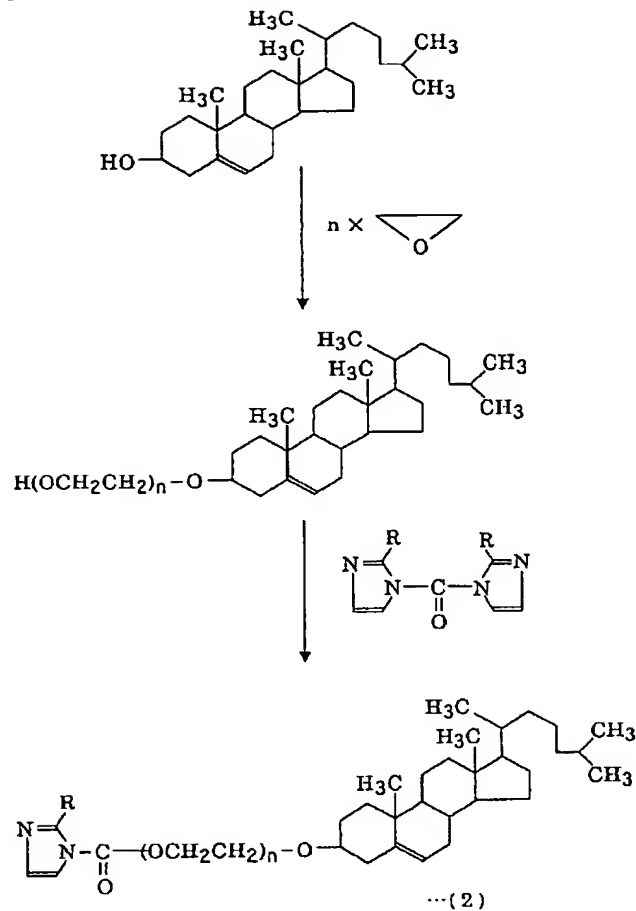
【0014】アルキレンオキシドとしてエチレンオキシドを用いた場合の反応式を下式(2)に示す。なお、式中、nおよびRは前記と同じものを示す。

【化3】

5

(4)

6



【0015】このようにして得られた本発明のコレステロール誘導体は、小胞体形成成分などとして使用することができる。ここで小胞体とは、本発明のコレステロール誘導体またはこのコレステロール誘導体と他の小胞体形成成分の親水基が界面の水相に向かって配向した構造を有する粒子を意味する。具体的なものとしては、二分子膜からなる閉鎖小胞であるリボソーム；植物油およびリン脂質等の混合物が乳化された脂肪乳剤；またはミセルなどがあげられる。

【0016】本発明のコレステロール誘導体は、アミノ基、水酸基またはチオール基などの官能基、特に第1級アミノ基に対して高い反応性のあるオキシカルボニルイミダゾール基またはその置換体を有しているので、このような官能基を有する機能性物質と容易に反応し、共有結合が形成される。このため本発明のコレステロール誘導体を小胞体形成成分として用いることにより、小胞体に（ポリ）オキシアルキレン鎖を導入できるとともに、前記官能基を有する機能性物質に対する反応性を付与することができる、反応性小胞体を製造することができる。

【0017】前記官能基を有する機能性物質としては特に限定されないが、抗体、酵素、核酸、糖類等の生体内由来物質や、化学発光物質、蛍光物質、ラジオアイソト

ープラベル化合物、染料、色素、医薬、農薬などが好ましくあげられる。

【0018】

【発明の効果】本発明のコレステロール誘導体は新規かつ有用である。本発明のコレステロール誘導体を小胞体形成成分として用いることにより、小胞体に（ポリ）オキシアルキレン鎖を導入することができるとともに、この（ポリ）オキシアルキレン鎖の先端に、簡単にかつ効率よく種々の機能性物質を共有結合により固定化することができる。

【0019】

【実施例】以下、実施例により、さらに詳細な説明を行うが、本発明はこれらに限定されない。

実施例1

オートクレーブ中にトルエン500ml、コレステロール10g（26mmol）および金属ナトリウム0.6g（26mmol）を加え、30分間攪拌した後、エチレンオキシド52g（1.2mol）を加え、100℃で24時間攪拌した。反応終了後、5%塩酸および蒸留水で洗浄し、さらにトルエンを減圧下に留去することにより、コレステロールの水酸基にエチレンオキシドが付加した中間体（以下、Chol-PEGという、分子量約240

30

40

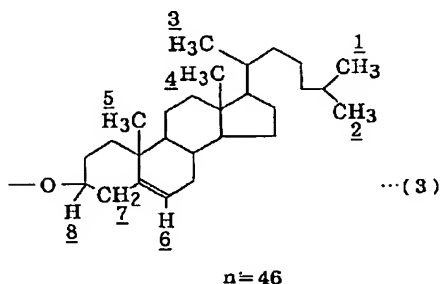
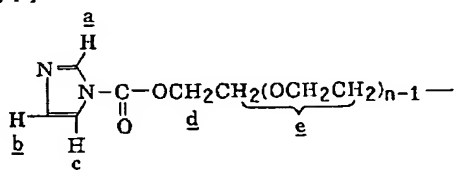
50

7

0、エチレンオキシドの付加モル数約46)を得た(収率96%)。さらに、クロロホルム10ml中に、上記Chol-PEG5g(2mmol)およびN,N'-カルボニルジイミダゾール0.32g(2mmol)を加え、室温で6時間攪拌した。反応終了後、ジエチルエーテル中に再沈殿精製し、白色粉末状の下式(3)で表わされるコレステロール誘導体を得た。反応の進行は、IRスペクトル(KBr法)においてChol-PEG中の水酸基(OH伸縮、3430cm⁻¹)の消失および=N-C(=O)-O-結合の生成(C=O伸縮、1760cm⁻¹)により確認した。

【0020】

【化4】



【0021】得られたコレステロール誘導体の¹H-NMRおよびIRの分析結果は次の通りである。

¹H-NMR(270MHz, CDCl₃, TMS, δ; ppm, J; Hz)

8.14 (a; s, 1H)

7.43 (b; s, 1H)

7.08 (c; s, 1H)

4.67 (d; t, 2H, J=2.5)

3.66 (e; m, 約182H)

5.37 (6; d, 1H, J=5.0)

4.44 (8; m, 1H)

2.33 (7; d, 2H, J=6.9)

2.05~1.0 (1~7以外のステロール骨格由来)

1.01 (5; s, 3H)

0.88 (3; d, 3H, J=1.0)

0.86 (1, 2; d, 6H, J=5.2)

0.68 (4; s, 3H)

IR(KBr法, cm⁻¹)

1760(C=O伸縮)

【0022】実施例2

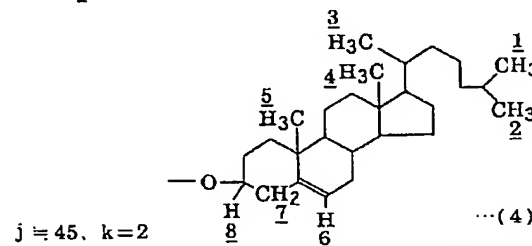
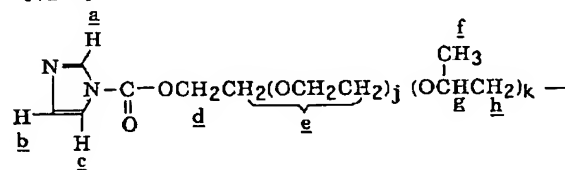
オートクレーブ中にトルエン500ml、コレステロー

8

ル10g(26mmol)および金属ナトリウム0.6g(26mmol)を加え、30分間攪拌した後、プロピレンオキシド3.02g(52mmol)を加え、100℃で4時間攪拌した後、さらにエチレンオキシド52g(1.2mol)を加え、100℃で24時間攪拌した。反応終了後、5%塩酸および蒸留水で洗浄し、さらにトルエンを減圧下に留去することにより、コレステロールの水酸基にプロピレンオキシドおよびエチレンオキシドがブロック状に付加した中間体(以下、Chol-PPG-PEGという、分子量約2500、プロピレンオキシドの付加モル数2、エチレンオキシドの付加モル数約46)を得た(収率95%)。さらに、クロロホルム10ml中に、上記Chol-PPG-PEG5g(2mmol)およびN,N'-カルボニルジイミダゾール0.32g(2mmol)を加え、室温で6時間攪拌した。反応終了後、ジエチルエーテル中に再沈殿精製し、白色粉末状の下式(4)で表わされるコレステロール誘導体を得た。反応の進行は、実施例1と同様にして確認した。

【0023】

20 【化5】



【0024】得られたコレステロール誘導体の¹H-NMRおよびIRの分析結果は次の通りである。

¹H-NMR(270MHz, CDCl₃, TMS, δ; ppm, J; Hz)

8.14 (a; s, 1H)

7.43 (b; s, 1H)

7.08 (c; s, 1H)

4.67 (d; t, 2H, J=2.5)

3.60 (e, g, h; m, 約182H)

1.12 (f; s, 約6H)

5.37 (6; d, 1H, J=5.0)

4.44 (8; m, 1H)

2.33 (7; d, 2H, J=6.9)

2.05~1.0 (1~7以外のステロール骨格由来)

1.01 (5; s, 3H)

0.88 (3; d, 3H, J=1.0)

0.86 (1, 2; d, 6H, J=5.2)

0.68 ($\underline{4}$; s, 3H)

IR (KBr法, cm^{-1})

1760 (C=O伸縮)

【0025】参考例1

卵黄ホスファチジルコリン20mg ($26\mu\text{mol}$)、コレステロール3.9mg ($10\mu\text{mol}$)および実施例1で得られたコレステロール誘導体2.4mg (前記二者に対して10wt%)をナス型フラスコに入れ、2mlのベンゼンで溶解させた後、凍結乾燥を行った。これに生理的食塩水1mlを加え、バス型超音波照射およびボ

ルテックスミキサーにより多重層リボソームを得た。さらにエクストルーダーにより3.0、1.0、0.2 μm のポリカーボネートメンブランを順次通過させ、大きな一枚膜の反応性リボソームを得た。得られた反応性リボソームの粒径をレーザー散乱粒度分布計(NICOMP社製、NICOMP370HPL、商標)を用い測定したところ、粒径181nm (CV値15%)であった。上記リボソームを5℃で3週間静置したのち、粒径を測定したところ195nm (CV値23%)であり、安定性に優れていた。